调节性 B 细胞在视神经脊髓炎谱系疾病外周血中的表达和意义

何丹，马建华，马娟，等. 调节性 B 细胞在视神经脊髓炎谱系疾病外周血中的表达和意义［J］. 中国全科医学，2023. ［Epub ahead of print］. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0031

何丹，马建华，马娟，杜磊，张艳，郝晨光*

基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学基金（No ：2017D01A05）
830054 新疆乌鲁木齐市，新疆医科大学第一附属医院神经内科
*通信作者：郝晨光，主任医师，硕士研究生导师，E-mail:haoqiang123321@sina.com
摘要 背景 视神经脊髓炎谱系疾病（NMOSD）系自身免疫性疾病，探讨免疫细胞和相关免疫因子的表达，寻找更多治疗和干预的方向。**目的** 研究调节性 B 细胞（Breg）在视神经脊髓炎谱系疾病外周血中的表达和意义；**方法** 选取自 2019 年 6 月至 2021 年 12 月神经内科病区收治的 NMOSD 患者 55 例，同期健康志愿者 50 例，运用流式细胞仪检测两组研究者外周血中 CD19+CD24hiCD38hi Breg、CD19+CD24hiCD27+Breg 的表达。采用酶联免疫吸附法(ELISA)比较和检测两组被检者血清中白细胞介素 10（IL-10）、白细胞介素 35（IL-35）和转化生长因子-β1 (TGF-β1)的水平。**结果** 相比于正常对照组，NMOSD 组 CD19+CD24hiCD38hi Breg、CD19+CD24hiCD27+Breg 在 CD19+B 细胞的占比均下降（5.82±2.59%，13.21±3.45%），差异具有统计学意义(P<0.05)。NMOSD 组的 IL-10 、IL-35、TGF-β1 水平均下降(42.80±7.63，181.19±38.49，8.84±4.41，pg/mL)，差异均有统计学意义(P<0.05)。**结论** 调节性 B 细胞及其细胞因子在 NMOSD 患者中表达下降，提示负性免疫调节在 NMOSD 疾病的发生和进展中发挥作用。
关键词 视神经脊髓炎谱系疾病，调节性 B 细胞，细胞因子

Number of regulatory B cells in peripheral blood in Neuromyelitis optic spectrum Disease patients and its clinical significance

HE Dan，MA Jianhua，MA Juan，Du Lei，ZHANG Yan，HAO Chenguang
Department of Neurology， the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University，Xinjiang Urumqi 830054 ，China
Corresponding author：HAO Chenguang，Chief Physician， Master's Supervisor；E-mail：haoqiang123321@sina.com
Background Neuromyelitis optica spectrum disease (NMOSD) is an autoimmune disease. To explore the expression of immune cells and cytokines and find more directions for treatment and intervention.**Objective** To explore the number of regulatory B cells (Breg) in peripheral blood of neuromyelitis optica spectrum disease and its clinical significance of NMOSD patiens. **Methods** a total of 55 patients with NMOSD were admitted to the Department of Neurology， from June 2019 to December 2021， and 50 normal healthy subjects during the same period were enrolled. Flow cytometry was used to detect the proportions of CD19+CD24hiCD38hi regulatory B cells and CD19+CD24hiCD27+ regulatory B cells in CD19+ lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells of the two groups. The serum levels of interleukin-10， IL-35 and transforming growth factor -β1 (TGF-β1) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** As compared with the control group， the proportions of CD19+CD24hiCD38hi Breg and CD19+CD24hiCD27+Breg in CD19+ lymphocytes in NMOSD group were decreased(（5.82±2.59%，13.21±3.45%）)， and the differences were statistically significant(P<0.05). As compared with the control group，the levels of IL-10， IL-35 and TGF-β1 in NMOSD group were decreased(42.80±7.63，181.19±38.49，8.84±4.41，pg/mL)， with statistical significance (P<0.05). **Conclusion** Regulatory B cells and their cytokines are down-regulated inpatients with NMOSD and play a role in the progression of NMOSD disease.

Key words: NMOSD; Regulatory B cells; Cytokines

前言

视神经脊髓炎谱系疾病(NMOSD)是近年来神经系统炎性脱髓鞘疾病领域研究和探索的重点，发病机制主要与自身免疫介导有关，临床症状多表现为长节段横贯性脊髓炎(LETM)和视神经炎(ON)等，因脱髓鞘的特点该病有较高的致残率和复发率[1]。从目前的流行病学数据来看，NMOSD 好发于青壮年尤其是女性，其患病率在全球各地区范围约为(0.5～10)/(10 万人 •年)，根据 2020 年住院登记系统的数据，中国的 NMOSD 发病率约为 0.278/(10 万人・年)，其中成人发病率略高为 0.347/(10 万人・年)[2]。目前发现 NMOSD 的发病机制主要与水通道蛋白4(AQP4)抗体有关，该抗体由外周血中的B淋巴细胞产生，可以穿过血脑屏障(BBB)，考虑可选择性地与中枢部分的靶抗原 AQP4 结合，特别是与存在于血-脑屏障（BBB）和脑-脑脊液屏障（CSF-BB）处的星形胶质细胞足突中突触末端的 AQP4 去结合，因此免疫调节尤其是 B 淋巴细胞免疫在 NMOSD 疾病发生和发展中发挥着重要的作用[3-4]。目前的研究提示，B 淋巴细胞除了引起体液免疫反应外，其存在的部分亚群调节性 B 细胞在多种不同的自身免疫性疾病中均可能存在负向的免疫调节作用，考虑与其分泌细胞因子参与炎性反应的发生有关，如 IL-10、IL-35、TGF-β1 等[5]，探索这类细胞 B 细胞亚群在免疫性脱髓鞘性脊髓炎的疾病中的表达和功能有助于 NMOSD 的机制研究。因此，本研究重点是检测 NMOSD 患者的外周血中 Breg 亚群和其细胞因子的水平，研究其在 NMOSD 疾病产生过程中的作用，提高对 NMOSD 患者免疫机制的认识。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

选取新疆医科大学第一附属医院神经内科病区从 2019 年 06 月到 2021 年 12 月诊治的 NMOSD 成人住院患者 55 例，设定为 NMOSD 病例组，其中女性 43 例，男性 12 例；平均年龄为 44.89±12.66 岁，范围自 21 至 77 岁，平均病程时间 3 天到 16 年。纳入标准：所有被纳入的 NMOSD 患者的确定诊断均参照 2016 年公布的《中国视神经脊髓炎谱系疾病诊断与治疗指南》[6]，由两位主治以上职称医师确认。排除标准：患有其他自身免疫性疾病以及其他恶性肿瘤、急性感染、器官移植术后、人类免疫缺陷病毒感染者等，排除入院前 3 个月内已经接受免疫球蛋白、大剂量激素或吗替麦考酚酯/利妥昔单抗/硫唑嘌呤等其他免疫调节药物治疗的患者。另选择同时期我院正常的健康志愿者 50 例为对照组，其中女性为 30 例，男性 20 例，平均年龄年龄 46.78±14.29 岁，范围为 20-70 岁。本研究获得医院伦理委员会审批(审批号院 K201910-06)，患者或家属知情统一后均签署同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 流式细胞术检测外周中调节性 B 细胞计数 ① NMOSD 组患者在入院后的次日清晨空腹，对照组人员在空腹体检时，各取肘静脉的乙二胺四乙酸（EDTA）新鲜抗凝全血 70μL 2 管，分别标记为 A 和 B。② 首先在 A 中依次加入 FITC-单克隆鼠抗人 CD19 抗体、PE-单克隆鼠抗人 CD24 抗体、APC-单克隆鼠抗人 CD38 抗体，其次在 B 中依次加入 FITC-单克隆鼠抗人 CD19 抗体、PE-单克隆鼠抗人 CD24 抗体和 APC-单克隆鼠抗人 CD27 抗体。在室温下混匀并避光孵育 18 分钟。③ 加入红细胞裂解液 2 mL，室温避光裂解 5 分钟，然后放置于台式高速离心机（美国 Beckman 公司），离心速度：2000 转/分钟，离心时间：5 分钟，弃去离心管上清液，使用 1 mL 磷酸盐缓冲溶液（PBS）洗涤，再次 2000 转/分钟速度离心 5 分钟，弃去上清加 PBS 3 mL 重悬。室温下避光后上流式细胞仪在室温下检测 Breg。

1.2.2 外周血清中细胞因子 IL-10、IL-35 和 TGF-β1 含量检测 ① 对实验组和对照组患者在空腹状态下分别采外周静脉血 5ml，离心机速度：1000 转/分钟，离心时间：20 分钟，离心半径为 10 cm，离心后分离出血清，置于-80℃冰箱后续待测。② 使用 ELISA 法检测两组被检者血清中 IL-10、IL-35 和 TGF-β1 细胞因子水平。严格按照试剂盒说明书进行实验过程，记录 IL-10、IL-35 和 TGF-β1 的测定值。

1.3 统计学方法 使用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析；计量资料以均数±标准差（$\overline{X}\pm S$）表示，比较采用独立样本 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 两组观察者细胞表型的比较 NMOSD 组 CD19+CD24hiCD38hiBreg 细胞表型比例为（5.82±2.59）%，对照组为（9.19±2.95）%，经 *t* 检验，差异有统计学意义（*t* =6.235，*P*<0.001）；NMOSD 组的 CD19+CD24hiCD27+Breg 细胞表型比例为（13.21±3.45）%，对照组为（23.05±4.70）%，经 *t* 检验，差异有统计学意义（*t* =12.131，*P* <0.001），见表 1、图 1。

2.2 两组观察者细胞因子水平的比较

与正常对照组相比，NMOSD 组的 IL-10 、IL-35、TGF-β 1 水平均有下降，经两组患者数据的 t 检验，差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2.

表 1 2 组患者 CD19+CD24hiCD38hiBreg、CD19+CD24hiCD27+Breg 细胞表型比例比较

Table 1 Comparison of the phenotype ratio of the CD19+CD24hiCD38hiBreg and CD19+CD24hiCD27+Breg cell between two groups

组别	例数	CD19+CD24hiCD38hiBreg（%）	CD19+CD24hiCD27+Breg（%）
对照组	50	9.19±2.95	23.05±4.70
NMOSD 组	55	5.82±2.59	13.21±3.45
t		6.235	12.131
P		<0.001	<0.001

注：NMOSD：视神经脊髓炎谱系疾病。

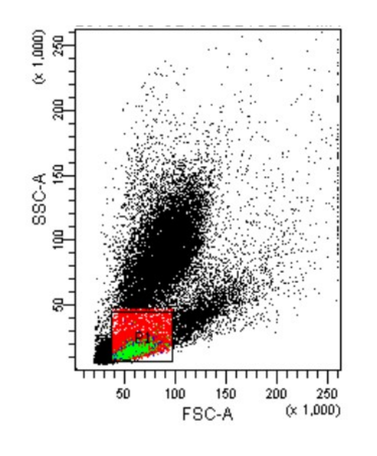
表 2 2 组患者细胞因子 IL-10 、IL-35、TGF-β1 结果比较(pg/mL，$\overline{X}\pm S$

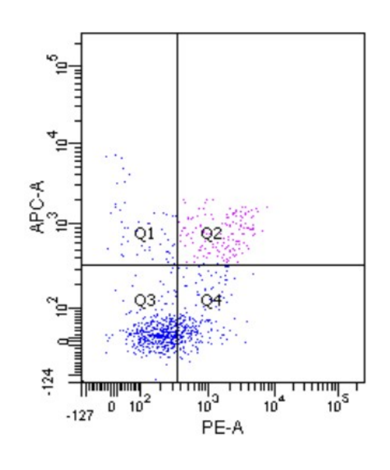
Table 2 Comparison of the result of Cytokines IL-10， IL-35 and TGF- β1 in patients of two groups(pg/mL，$\overline{X}\pm S$）)

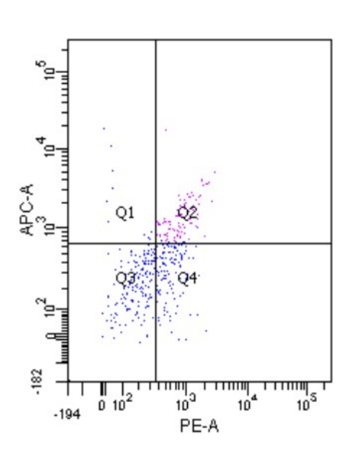
组别	例数	IL-10	IL-35	TGF-β1
对照组	50	51.41±12.35	251.24±56.89	10.81±5.41
NMOSD 组	55	42.80±7.63	181.19±38.49	8.84±4.41
t		4.249	7.316	2.057
P		<0.001	<0.001	0.042

注：IL-10：白细胞介素-10，IL-35：白细胞介素-35，TGF-β1：转化生长因子-β1

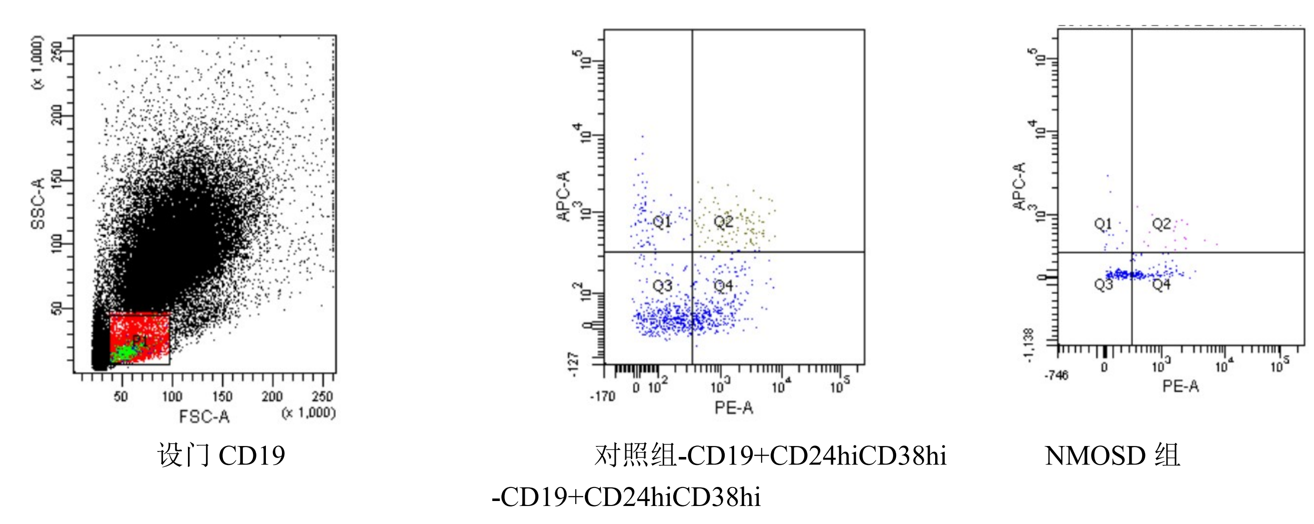
2.3 两组患者外周血 CD19+CD24hiCD38hi Breg、CD19+CD24hiCD27+Breg 的表达，见图 1。







设门 CD19　对照组-CD19+CD24hiCD27+　NMOSD 组 CD19+CD24hiCD27+



设门 CD19　对照组-CD19+CD24hiCD38hi　NMOSD 组 -CD19+CD24hiCD38hi

图 1 两组患者外周血 CD19+CD24hiCD27+ 、CD19+CD24hiCD38hi 表达散点图

Fig. 1 Scatter diagram of CD19+CD24hiCD27+，CD19+CD24hiCD38hi expression in peripheral blood of patients in two groups

3 讨论

视神经脊髓炎谱系疾病（NMOSD）是一组由自身免疫介导的中枢神经系统（CNS）炎性脱髓鞘性疾病，多数学者认为其与 B 细胞介导的体液免疫有关的一类疾病，可能的发病机制是 AQP4-IgG 高度聚集在中枢系统脊髓的灰质、中脑导水管脑室周围等处，尤其是血-脑屏障（BBB）和脑-脑脊液屏障处（CSF-BB）的星形胶质细胞的足突中，继而引起了 NMOSD 的发病[3, 7]。随着对其发病机制的不断深入研究发现，免疫耐受异常可能也是 AQP4-IgG 产生的重要因素。

既往研究表明，体液免疫中 B 淋巴细胞主要通过分泌抗体和抗原提呈作用来激活免疫反应从而发挥正向免疫调节作用，而近年来对于 B 细胞亚群研究的热点是一类具有负性免疫调节功能的 B 细胞—调节性 B 淋巴细胞（Bregs），它对维持机体的免疫耐受和稳态同样在发挥重要作用。自上世纪 90 年代以来，越来越多的关于调节性 B 淋巴细胞与自身免疫性疾病关系的实验和研究结果发表，逐渐揭开了这个 B 细胞亚群在免疫性疾病中的作用。在实验性自身免疫性脑脊髓炎（EAE）的动物模型中，Wolf[8]等学者首次发现，由于遗传性 B 淋巴细胞缺陷的实验小鼠体内诱导的 EAE 更易发生病情恶化，而野生型小鼠却有自愈的倾向，这提示小鼠体内存在一种抑制免疫炎性反应的 B 细胞亚群，而随后的研究中证实，Bregs 可以参与调节炎症免疫反应、维持/诱导调节 T 淋巴细胞和预防自身免疫等病理过程[9]。

与天然调节性 T 淋巴细胞不同，目前的人类和动物研究模型发现，任何 B 细胞都可能在适当的环境刺激下分化为 Bregs，包括幼稚 B 细胞、未成熟 B 细胞和浆细胞等。虽然在介导炎性反应中，Bregs 不直接调节 T 细胞的增值，但通过分泌以 IL-10 为主的细胞因子，对辅助 T 细胞(Th)1 和 Th17 的分化进行抑制，降低树突状细胞(dendriticcells，DC)的抗原提呈作用，减少其致炎因子的分泌作用，从而间接影响 T 细胞的增殖和分化从而发挥负向免疫调节作用[10]。

截至目前，Bregs 的表型尚没有统一的标准，而在不同的疾病模型中，有多种不同的表型和交叉重叠的表型被报道和证实。尽管动物实验发现其表型多样，但目前研究发现与人体内负向免疫调节功能有关的 Bregs 细胞表型主要是 CD19+CD24hiCD38hi 和 CD19+CD24hiCD27+[10]，通过产生细胞因子抑制 CD4+T 细胞增殖以及 IFN-g/IL-17 的表达，并且 CD24hiCD27+B 细胞在抑制 CD4+T 细胞增殖和 IFN-g/IL-17 表达方面比 TBs 更有效[11]。本研究结果显示，通过流式细胞术检测，分析 NMOSD 组和正常对照人群的调节性 B 细

胞亚群，我们发现 NMOSD 组患者的 CD19+CD24hiCD38hi Bregs、CD19+CD24hiCD27+Bregs 比例均低于正常对照组，提示以上 Bregs 可能也参与了 NMOSD 患者的疾病发生和发展进程。同样，在其他自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮的研究中[12]，对实验组患者的外周血调节性 B 淋巴细胞表型的计数分析讨论后，可见 Bregs 的表达下降对疾病的活动度、疾病特征和进展有一定的提示意义，但在 Sara[13]学者的研究中，对于单纯视神经炎患者淋巴细胞表型的分析中，CD19+CD24hiCD38hiBregs 较对照组更高，且 CD19+CD24hiCD38hiBregs 和 CD19+CD24hiCD27+Bregs 表达的计数水平存在一定的差异，因此，对于免疫疾病中调节性 B 淋巴细胞两种表型的有效性仍有待于进一步研究。

IL-是一种非常经典的具有抗炎作用的细胞因子，在抑制疾病的活动、发生和预防方面均发挥作用，IL-10 可降低树突状细胞(DCs)在抗原提呈过程中促炎细胞的细胞因子和分子主要组织相容性复合体(majorhistocompatibility complex，MHC)I、MHCII、粘附分子等的表达[14]。近年来，在其他神经系统自身免疫性疾病（如多发性硬化、重症肌无力、吉兰巴雷综合征[9，15-16]）等疾病中，均发现 IL-10 不同程度的介导和参与了负向免疫的炎症反应过程，同样在本研究中，NMOSD 组的 IL-10 水平较正常对照组下降，考虑与此有关的负向免疫调节功能下调有关。

IL-35 是近年来发现的 IL-12 细胞因子的新家族成员，主要作用是调节 T 细胞的动态平衡，它可以抑制 Th2 和 Th17 的产生，抑制 CD4+的效应，可作用 IL-35 受体激活信号传感器和转录激活物(STAT)1/STAT3 通路，诱导人 B 细胞分化为 IL-10 和产生 IL-35 的 Breg 细胞，抑制自身免疫性疾病的过度炎性反应，从而发挥负向免疫调节作用[9]。在本实验中，对两组患者的 IL-35 水平测定后发现，相比正常对照组，NMOSD 的患者的 IL-35 水平显著下降。这些也与既往的部分研究结果相符，表明在 NMOSD 的患者中，IL-35 参与了负向的免疫反应和调节。

TGF-β1 及其家族成员具有多效性，其作用与细胞类型和环境有关。TGF-β 参与调节 B 细胞发育的各个阶段，在控制自身耐受和自身免疫中起重要作用。目前已被证实在 Breg 的负向免疫调节中发挥了重要功能，在对促进移植耐受的机制研究中发现，通过过继转移，能够产生 TGF-β 的 Breg 细胞诱导 CD4+CD25−T 细胞中 Foxp3 的表达，促进 Tregs 的增加，进而诱导免疫耐受[17]。在对 B 细胞中特异性缺乏 TGF-β1 的转基因小鼠与野生型对照相比，EAE 的发展速度加快，这与中枢神经系统中树突状细胞活化频率的增加和致病 IFN-γ+ IL-17+ CD4+ T 细胞的增加有关，提示 TGF-β+ Bregs 对炎症性 T 细胞的间接控制[18]。在本研究中，TGF-β1 的数值下降考虑与 NMOSD 疾病的负向免疫调节减弱有关，NMOSD 患者的 TGF-β1 表达下降是否直接影响 B 细胞免疫中抗原提呈功能和具体的调节机制仍需进一步研究证实。

本研究旨在分析 NMOSD 患者和健康对照组的调节性 B 淋巴细胞的表型比例，同时使用 ELISA 法对其主要的细胞因子 IL-10、IL-35、TGF-β1 的水平进行检测，通过比较发现 CD19+CD24hiCD38hi Bregs、CD19+CD24hiCD27+ Bregs 的计数与 NMOSD 相关，且 NMOSD 组患者三种细胞因子的水平均下降，进一步说明负向免疫调节有关的细胞因子在其疾病的发生过程中发挥作用。

综上所述，免疫系统的动态平稳是维持免疫稳定的重要因素，且当前 NMOSD 的发病机制仍未阐明，通过本研究发现，在 NMOSD 组患者中，CD19+CD24hiCD38hi Bregs、CD19+CD24hiCD27+Bregs 及其主要细胞因子 IL-10、IL-35、TGF-β1 的水平均下降，提示调节性 B 淋巴细胞在视神经脊髓炎谱系疾病的发生发展环节中发挥了重要的作用。目前自身免疫性疾病中更多的研究和诊疗方向在 Treg，因此，发现更多的免疫靶点并进行动态的检测和复查有望为 NMOSD 患者提供更多的方向。另外，由于本研究为单中心研究，NMOSD 发病率低，因此整体样本量较少，期待未来有更多多中心、大样本或前瞻性随机对照试验对本研究进行证实及补充。

作者贡献：郝晨光、何丹、马建华进行文章的构思与设计；何丹进行研究的实施与可行性分析，统计学处理，结果的分析与解释，撰写论文并修订论文；何丹、马娟、张艳进行数据整理，杜磊、郝晨光负责文章的质量控制及审校；何丹、郝晨光对文章整体负责，监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] 中国免疫学会神经免疫分会， 黄德晖， 吴卫平，等. 中国视神经脊髓炎谱系疾病诊断与治疗指南(2021版)[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志， 2021， 28(6):14.
[2] Tian DC，Li Z ， Yuan M ， et al. Corrigendum to 'Incidence of neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) in China: A national population-based study'[J]. The Lancet regional health. Western Pacific，2020.8:100118.
[3] Lennon， V. A . IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel[J]. Journal of Experimental Medicine， 2005， 202(4):473-477.
[4] 马如雪，于秀军. 水通道蛋白4抗体阳性与阴性视神经脊髓炎谱系疾病发病机制及临床特点比较分析[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志，2018，25(4):292-298.
[5] Mizoguchi， F I， Preffer， et al. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease.[J]. International immunology， 2000.
[6] 中国免疫学会神经免疫学分会，中华医学会神经病学分会神经免疫学组，中国医师协会神经内科分会神经免疫专业委员会. 中国视神经脊髓炎谱系疾病诊断与治疗指南[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志，2016，23(3):155-166.
[7] Vincent T，Saikali P，Cayrol R ， et al. Functional consequences of neuromyelitis optica-IgG astrocyte interactions on blood-brain barrier permeability and granulocyte recruitment.[J]. Journal of Immunology ，2008， 181(8):5730-5737.
[8] Wolf， S. D . Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induction in Genetically B Cell－deficient Mice[J]. Journal of Experimental Medicine， 1996， 184(6):2271-2278.
[9] Zhou R ， Luo Y B ， Zeng Q M ， et al. Regulatory B Cells and Its Role in Central Nervous System Inflammatory Demyelinating Diseases[J]. Frontiers in Immunology， 2020， 11:1884.
[10] A V， Sokolov， A A， et al. B Cell Regulation in Autoimmune Diseases.[J]. Acta naturae， 2018.
[11] Hasan M M ， Thompson-Snipes L ， Oh S ， et al. CD24hiCD38hi and CD24hiCD27+ Human Regulatory B Cells Display Common and Distinct Functional Characteristics[J]. The Journal of Immunology， 2019.
[12] 闫成兰， 杨金华， 吴萌，等. CD19~+CD24~(hi)CD38~(hi)调节性B细胞在系统性红斑狼疮患者的表达及意义[J]. 中国药物与临床， 2020(15).
[13] Sara， Lundqvist， Signe， et al. Frequency and immunophenotype of IL10 producing regulatory B cells in Optic Neuritis.[J]. Immunology， 2018.
[14] 韩婉君， 刘雅微， 杨丹. 调节性B细胞参与多发性硬化发病的研究进展[J]. 国际免疫学杂志， 2021，44(1):5.
[15] Lin Y， Chang T， Lin J， Sun C， Wei C， Zhao J， Liu R， Yang K and Li Z (2022) Regulatory B Cells Are Decreased and Functionally Impaired in Myasthenia Gravis Patients. Front. Neurol. 13:808322.
[16] 郝晨光，王艳，马建华. 调节性B细胞在吉兰-巴雷综合征患者外周血中的表达及意义[J]. 中国现代医学杂志，2020，30(4):34-38.
[17] Lee K M，Stott R T，Zhao G ， et al. TGF-β-producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance.[J]. European Journal of Immunology， 2014， 44(6):1728-36.
[18] D Catalán， Mansilla M A ， Ferrier A ， et al. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells[J]. Frontiers in Immunology， 2021， 12.